



(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C07K 14/775, A61K 38/17	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/05227 (43) Date de publication internationale: 22 février 1996 (22.02.96)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01076</p> <p>(22) Date de dépôt international: 10 août 1995 (10.08.95)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 94/10037 16 août 1994 (16.08.94) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): LABORA-TOIRES FOURNIER S.C.A. [FR/FR]; 9, rue Petitot, F-21000 Dijon (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BÜTTNER, Klaus [DE/DE]; Bergstrasse 19, D-66129 Bülbingen (DE). DASSEUX, Jean-Louis [DE/DE]; Hanna-Kirchner-Strasse 7, D-66123 Saarbrücken (DE).</p> <p>(74) Mandataire: CLISCI, Serge; S.A. Fédit-Loriot & Autres, Conseils en Propriété Industrielle, 38, avenue Hoche, F-75008 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: CA, FI, JP, KR, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i></p>
<p>(54) Title: PEPTIDES INHIBITING THE CHOLESTEROL ESTER TRANSFER PROTEIN AND THERAPEUTIC USES THEREOF</p> <p>(54) Titre: PEPTIDES INHIBITEURS DE LA PROTEINE DE TRANSFERT DES ESTERS DE CHOLESTEROL ET LEUR UTILISATION EN THERAPEUTIQUE</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention discloses a peptide which is a fragment of apoprotein AII, having the formula ΔN_x Pep ΔC_y, wherein Pep is the 27-77 fragment of apoprotein AII (monomeric form) and corresponds to the sequence EKVKSPELQA EAKSYFEKSK EQLTPLIKKA GTELVNFLSY FVELGTQPAT Q, ΔN_x is a deletion of x N-terminal amino acids of the Pep peptide as defined above, ΔC_y is a deletion of y C-terminal amino acids of the Pep peptide as defined above, x is an integer of 0 to 31 inclusive, and y is an integer of 0 to 4 inclusive. The peptide of the invention is useful for example in the treatment of dyslipidemias.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention a trait à un peptide, fragment de l'apoprotéine AII, caractérisé en ce qu'il répond à la formule (I): ΔN_x Pep ΔC_y, dans laquelle Pep est le fragment 27-77 de l'apoprotéine AII (forme monomère) et correspond à la séquence: EKVKSPELQA EAKSYFEKSK EQLTPLIKKA GTELVNFLSY FVELGTQPAT Q ΔN_x correspond à une délétion des x acides aminés N-terminaux du peptide Pep défini ci-dessus, ΔC_y correspond à une délétion des y acides aminés C-terminaux du peptide Pep défini ci-dessus, x est un nombre entier compris entre 0 et 31 (ces valeurs étant incluses), y est un nombre entier compris entre 0 et 4 (ces valeurs étant incluses). Ce peptide est utile en thérapeutique, notamment vis-à-vis des dyslipidémies.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

**PEPTIDES INHIBITEURS DE LA PROTEINE DE TRANSFERT DES ESTERS
DE CHOLESTEROL ET LEUR UTILISATION EN THERAPEUTIQUE.**

5 DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention concerne en tant que produits nouveaux des peptides, fragments de l'apoprotéine AII (apoAII), et leur utilisation en thérapeutique, notamment pour le traitement des dyslipidémies et la prévention des maladies cardio-vasculaires.

10 ART ANTERIEUR

Dans les pays industrialisés, les maladies cardio-vasculaires représentent la principale cause de mortalité et constituent un problème majeur, à la fois clinique et économique, en santé publique.

Plusieurs études épidémiologiques montrent que l'un des principaux
15 facteurs de risque est une concentration sérique élevée en cholestérol associé aux lipoprotéines de faible densité (LDL-chol). Elles indiquent aussi que le risque de développer une maladie cardio-vasculaire est inversement proportionnel à la concentration sérique en lipoprotéines de forte densité (les HDL). Cependant, il est difficile de déterminer si les concentrations élevées de HDL sont la conséquence
20 d'une activité métabolique anti-athérogène ou si les HDL sont directement impliquées dans la prévention de l'athérome.

Les HDL joueraient un rôle important dans le "Reverse Cholesterol Transport" (RCT), c'est à dire, dans l'excrétion du cholestérol cellulaire périphérique en favorisant le transfert de celui-ci vers le foie pour élimination.

25 Les cellules intestinales et hépatiques sécrètent dans le flux sanguin des HDL naissantes. L'apoprotéine AI (apoAI) est la protéine majoritaire des HDL, elle s'associe aux phospholipides pour former un complexe soluble susceptible d'accueillir des lipides et en particulier du cholestérol. La majeure partie des apoprotéines (dont l'apoAI) et des phospholipides constituant les HDL est issue des
30 lipoprotéines riches en triglycérides (TG). Durant leur séjour dans le compartiment plasmatique, les HDL vont incorporer des apoprotéines (apoAI, apoAII, apo C's,...) provenant du métabolisme des lipoprotéines riches en TG et des phospholipides (PL) résultant de la lipolyse des VLDL (lipoprotéines de très faible densité) et des chylomicrons. Elles vont aussi acquérir du cholestérol provenant des
35 cellules des tissus extrahépatiques et d'autres lipoprotéines. L'efflux du cholestérol

des cellules périphériques (non hépatiques) vers les HDL est la première étape du RCT. C'est une étape critique dans l'homéostasie du cholestérol puisque la plupart des cellules ne peuvent pas cataboliser le cholestérol exogène qu'elles accumulent.

Au sein des HDL, la "Lecithin Cholesterol Acyl Transférase" (LCAT)
5 catalyse l'estérification du cholestérol. Cette réaction génère un potentiel de gradient de concentration en cholestérol entre les cellules extrahépatiques et les HDL qui favorise l'efflux cellulaire du cholestérol. La LCAT est responsable de la formation de la majorité des esters de cholestérol présents dans le plasma. Ces esters constituent la forme principale sous laquelle le cholestérol est transporté dans
10 le plasma.

Ceci va conduire à la formation de HDL matures, sphériques et ayant une taille accrue. Les HDL subissent alors l'action de différentes protéines comme la lipase hépatique et la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP). La CETP est une glycoprotéine de 74000 Da responsable du transfert des esters de
15 cholestérol (CE), formés par la LCAT au sein des HDL, vers les lipoprotéines contenant l'apoprotéine B, comme les lipoprotéines riches en TG, les VLDL et les chylomicrons. Comme le transfert des CE se fait en échange du transfert des TG, les HDL se retrouvent enrichies en TG. Elles deviennent un substrat pour des enzymes lipolytiques comme la lipase hépatique qui métabolise les TG en acide
20 gras.

Alors que les lipides des HDL sont catabolisés, la particule restante peut être recyclée pour favoriser l'efflux du cholestérol cellulaire ou bien être dégradée via un site de fixation au niveau du foie (l'hypothétique récepteur des HDL n'ayant à ce jour pas été caractérisé).

25 Sous l'action de la CETP et des lipases, les VLDL sont métabolisées en particules plus petites, les "VLDL remnants" dont la composition en phospholipides (PL), en TG et en apoprotéines est modifiée suite aux différents échanges entre les lipoprotéines. Soit ces particules sont éliminées après interaction avec des récepteurs spécifiques, soit elles continuent à accumuler du CE, à s'appauvrir en
30 TG et deviennent des particules plus denses : les lipoprotéines de faible densité (les LDL).

Les LDL se caractérisent par la présence majoritaire d'une seule apoprotéine, (l'apo B) et d'un noyau riche en CE entouré par une couche de phospholipides et de cholestérol. Les LDL sont éliminées du plasma par deux
35 voies, l'une régulée par un récepteur, l'autre indépendante d'un récepteur.

Chez un sujet normal, chaque jour, un tiers des LDL est éliminé par l'intermédiaire d'un récepteur à haute affinité, tandis que les deux tiers environ sont éliminés par des mécanismes non-spécifiques. Après avoir interagi avec un récepteur spécifique reconnaissant l'apo B, les LDL sont internalisées et dégradées
5 au niveau du foie ou d'autres tissus.

Les LDL sont susceptibles d'être oxydées. Ces LDL oxydées (ox-LDL) sont alors reconnues par un récepteur à la surface des cellules endothéliales et des macrophages. L'internalisation de ces LDL oxydées conduit à la formation de cellules riches en CE, les cellules spumeuses qui participent à la formation des
10 plaques d'athérome.

Les modifications du profil lipoprotéique résultant de l'activité de la CETP suggèrent que celle-ci pourrait être impliquée dans l'athérogénèse. Cette analyse est renforcée par plusieurs observations :

A l'exception du cochon, les animaux ayant une activité CETP faible sont
15 résistants à l'athérosclérose induite par un régime alimentaire gras.

L'injection d'anticorps neutralisants dirigés contre la CETP chez le lapin augmente les CE dans les HDL et diminue les TG dans les HDL.

Les souris transgéniques exprimant la CETP ont un profil lipoprotéique modifié, associé avec le développement de plaques d'athérome.

20 Plusieurs observations cliniques tendent à montrer que, chez l'homme, une activité CETP élevée est corrélée avec un risque athérogène accru.

Enfin, les personnes déficientes en CETP sont caractérisées par un profil peu athérogène, c'est à dire des concentrations faibles en LDL et élevées en HDL.

25 Pour plus de détails concernant le rôle de la CETP, on pourra se reporter à des articles tels que Swenson (Current. Opin. Lipid., 1992, 3, 67-74) ou Tall (J. Lipid Res., 1993, 34, 1255-1274).

L'identification des facteurs régulant l'activité de la CETP présente un grand intérêt afin de développer des médicaments pour lutter contre les maladies
30 cardio-vasculaires et l'athérosclérose.

En particulier, l'inhibition de l'activité de la CETP semble être un élément favorable au traitement ou à la prévention de l'athérosclérose. Par exemple il a été suggéré dans le brevet US-A-5279540 d'éliminer la CETP du flux sanguin afin de réduire le risque athéromateux. Une autre voie d'approche est proposée
35 dans la demande PCT WO 93/11782 qui préconise l'administration de peptides

dérivés de la fraction N-terminale de l'apolipoprotéine C1 de babouin pour inhiber l'activité de la CETP et ainsi diminuer le risque d'athérosclérose, ou dans la demande PCT WO 93/15198 qui utilise des polypeptides dérivés de l'apoprotéine AIV pour le traitement des hypercholestérolémies ou pour diminuer les risques d'accidents coronariens, sans toutefois préciser un mode d'action lié à la CETP.

Le rôle des apoAI et apoAII a fait l'objet de diverses publications comme par exemple Ohnishi (Biochemistry, 1993, 32, 5029-5035) qui attribue un caractère activateur aux apoAI et apoAII dans le transfert des lipides plasmatiques, alors que Rye (J. Lipid Res., 1992, 33, 215-224) et Lagrost (J. Biol. Chem., 1994, 269, 3189-3197) semblent démontrer un rôle inhibiteur de l'apoAII sur l'activité de la CETP. La détermination du rôle de l'apoAII a été tentée à l'aide de souris transgéniques qui expriment l'apoAII humaine en quantité importante et qui développent des plaques d'athérosclérose quand elles sont soumises à un régime gras ou riche en cholestérol (Nature, 1993, 365, 762-764). Toutefois, il est à souligner que la présence de CETP n'a jamais été démontrée chez la souris.

La demande de brevet JP-A-63-237 795, qui décrit un procédé de fabrication de l'apoAII suggère également son utilisation dans l'étude et la thérapie des hyperlipidémies. D'une façon générale, la demande de brevet PCT WO 87/02062 suggère d'utiliser les portions amphiphyles d'apoprotéines pour favoriser le transport reverse du cholestérol.

Par ailleurs, l'étude de l'apoAII a conduit certains auteurs comme S.J.T. Mao (Biochemistry, 1977, 16, 4150-4156 ; Biochemistry, 1981, 20, 1676-1680 et Peptides, 1983, 4, 343-349) à préparer des fragments de l'apoAII afin d'identifier les sites d'interaction de l'apoAII avec les phospholipides.

OBJET DE L'INVENTION

La présente invention propose en tant que produits nouveaux, des fragments de l'apoprotéine AII (apoAII) qui ont la propriété d'inhiber l'activité de la CETP et qui, du fait de cette propriété, peuvent être utilisés pour fabriquer des médicaments permettant de lutter contre les dyslipidémies et les conséquences qui y sont liées, telles que l'athérosclérose et ses complications vasculaires notamment coronariennes.

La présente invention concerne les peptides dont la structure répond à la formule générale :

dans laquelle :

- Pep représente le fragment 27-77, de l'apoprotéine AII (obtenu par action du bromure de cyanogène sur l'apoprotéine AII) et correspond à la séquence :

5

EKVKSPQLQA EAKSYFEKSK EQLTPLIKKA GTELVNFLSY
FVELGTQPAT Q

(SEQ ID No. 1)

- 10 - ΔN_x représente une délétion des x acides aminés N-terminaux
- ΔC_y représente une délétion des y acides aminés C-terminaux.
- x représente un nombre entier compris entre 0 et 31 (ces valeurs étant incluses),
- y représente un nombre entier compris entre 0 et 4 (ces valeurs étant incluses).

Dans la suite du texte, un produit noté par exemple " ΔN_{10} Pep"
15 signifie qu'il s'agit du fragment correspondant à une délétion des 10 acides aminés N-terminaux de la séquence SEQ ID No. 1, l'extrémité C-terminale n'ayant pas été modifiée ; ce peptide correspond donc au fragment 37-77 de la structure primaire de l'apo AII.

Les peptides selon l'invention sont des inhibiteurs de la CETP. Un
20 autre objet de l'invention est l'utilisation de l'un au moins de ces peptides pour la fabrication d'un médicament utile pour le traitement ou la prévention des hypercholestérolémies et des effets qui y sont liés comme par exemple l'athérosclérose et ses complications, notamment les accidents cardio-vasculaires.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

25 Les peptides selon l'invention peuvent être synthétisés en utilisant la plupart des techniques de synthèse peptidique aujourd'hui disponibles. D'une manière générale ces techniques impliquent une synthèse, étape par étape, permettant l'addition successive de chaque acide aminé à la chaîne polypeptidique qui croît progressivement. La synthèse peptidique peut aussi être réalisée par con-
30 densation de plusieurs fragments peptidiques et/ou en utilisant des enzymes dans des conditions particulières (comme les protéases en milieu organique).

Les acides aminés sont liés entre eux par condensation entre le groupement carbonyle d'un acide aminé et le groupement amine de l'autre acide aminé, pour former la liaison peptidique. Les groupements protecteurs sont choisis
35 afin d'être éliminés facilement et pour ne pas influencer négativement (notamment

racémisation ou hydrolyse des liaisons peptidiques formées) sur la synthèse des polypeptides. Certains acides aminés ont d'autres groupements fonctionnels sur une chaîne latérale, comme par exemple le groupement hydroxyle de la tyrosine. Il est d'habitude nécessaire de bloquer ces groupements fonctionnels avec des groupements de protection, faciles à éliminer une fois la synthèse du polypeptide terminée, de telle manière qu'ils n'interfèrent pas lors de la formation des liaisons peptidiques.

Plusieurs méthodes ont été développées pour la synthèse peptidique. Elles sont caractérisées par différents protocoles d'activation et de coupure, ou par utilisation de différents groupements de protection, etc. Un grand nombre de groupements de protection ont été créés et optimisés en fonction des protocoles de synthèse.

La plupart des techniques de synthèse peptidique sont applicables à cette invention. La méthode préférée dans cette invention est celle de la synthèse peptidique en phase solide décrite par R.B. Merrifield adaptée de manière à utiliser des acides aminés protégés en position N.α. par un groupement 9-fluorènylméthoxycarbonyle (Fmoc).

Le concept fondamental de la synthèse peptidique en phase solide (SPPS) est basé sur l'addition séquentielle d'acides aminés N.α. protégés, ayant si nécessaire les chaînes latérales protégées par des groupements appropriés, sur un support polymérique insoluble (la résine) afin d'obtenir un peptide ayant son extrémité C-terminale attachée au support par l'intermédiaire d'un bras.

La stratégie Fmoc emploie un système orthogonal où le groupement protecteur de l'amine en α est labile en conditions basiques et la liaison peptide - résine, ainsi que les groupements protecteurs des chaînes latérales, sont labiles en conditions acides.

La synthèse Fmoc commence de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale.

Les acides aminés ont leur groupement α-aminé protégé par un groupement 9-fluorènylméthoxycarbonyle (Fmoc) et les chaînes latérales par un autre groupement comme par exemple dans le cas de la tyrosine un groupement t-butyle. Comme tous les peptides de cette invention ont un groupement carboxylique terminal libre, une résine de Wang est utilisée comme support solide pour chaque synthèse. La résine de Wang, permet d'obtenir, après coupure en milieu acide, le peptide avec un groupement carboxylique terminal libre. De plus, elle est

disponible dans le commerce (Novabiochem ou Saxon Biochemicals) avec le premier acide aminé en position C-terminale déjà attaché.

Durant la synthèse, l'addition des acides aminés subséquents s'effectue selon un protocole répétitif en deux étapes. La première étape est la déprotection
5 du groupement protecteur de l'amine en α par une solution diluée (20 %) de piperidine dans de la N-méthyl-pyrrolidone (NMP). Ceci résulte dans l'obtention d'un groupement α -aminé qui est déprotégé. La deuxième étape est la réaction de couplage qui permet d'introduire un acide aminé dont la fonction amine α est protégée par un groupement Fmoc. Différentes méthodes de couplage sont
10 possibles, parmi lesquelles on préfère l'utilisation de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) en présence de 1-hydroxybenzotriazole (HOBT) afin de former l'ester activé de l'acide aminé à coupler.

La synthèse s'effectue en répétant ce cycle pour l'addition de chaque acide aminé au peptide.

15 La séparation finale du peptide de la résine et l'élimination des groupements protecteurs des chaînes latérales (déprotection) sont réalisées à température ambiante pendant trois heures dans une solution contenant 90 % d'acide trifluoroacétique et des molécules protectrices ou scavengers, (5 % d'anisol, 2 % d'eau, 3 % de dodecanethiol), afin par exemple d'empêcher la *tert*-butylation causée par
20 la génération de cations *tert*-butyle. Le protocole détaillé est donné dans la partie expérimentale qui suit.

PARTIE EXPERIMENTALE

Toutes les synthèses de peptides sont conduites à l'aide d'un système automatisé Modèle 430 de Applied Biosystems, en utilisant la méthodologie de
25 protection "Fmoc" pour l'amine en position α des acides aminés. Pour plus de détails on peut se reporter au manuel utilisateur de ce type d'appareil qui décrit les protocoles de synthèse.

Les synthèses réalisées sur le synthétiseur automatique sont en général conduites à partir de $0,25 \cdot 10^{-3}$ mole d'acide aminé supporté.

30 a) Libération de l'amine de la résine de Wang

Pour la synthèse des peptides selon l'invention pour lesquels, dans la formule I, $y = 0$, l'acide aminé C-terminal sera une glutamine. On choisit donc comme produit de départ une résine selon Wang (JACS, 1973, 95, 1328) à base de polystyrène réticulé avec 1 % de divinylbenzène, fonctionnalisée avec un bras de
35 liaison du type alcool 4-alcoxy-benzylique, portant déjà une glutamine protégée

estérifiée sur le bras de liaison. Cette résine, ainsi substituée, est disponible dans le commerce (Novabiochem). La fonction amine, protégée par un groupement Fmoc, est libérée par action d'une solution de pipéridine à 20% dans la N-méthylpyrrolidone. La résine est ensuite lavée avec de la N-méthylpyrrolidone.

5 **b) Condensation du second acide aminé**

Le second acide aminé est une thréonine. On utilise ici une L-thréonine protégée sur la fonction amine par un groupement Fmoc et sur la fonction alcool par un groupement t-butyle. La condensation de la fonction acide libre sur la fonction amine libre de la glutamine portée par la résine de Wang est faite après
10 activation de la fonction acide en présence de DCC (dicyclohexycarbodiimide) et de HOBt (1-hydroxy-benzotriazole).

Après traitement avec le mélange réactionnel la résine est lavée avec de la N-méthylpyrrolidone. Afin d'assurer un bon rendement de condensation, la résine est mise une nouvelle fois en contact avec le mélange réactif puis à nouveau
15 lavée.

On ajoute ensuite une solution de pipéridine à 20% dans la N-méthylpyrrolidone, afin d'éliminer le groupement Fmoc protégeant la fonction amine de la thréonine, puis on lave la résine avec de la N-méthylpyrrolidone.

De façon analogue, on condense les acides aminés suivants par une
20 suite de réactions semblables, en utilisant chaque fois 4 équivalents d'acide aminé à greffer pour 1 équivalent de peptide supporté par la résine.

Dans le cas de la synthèse de peptides comportant plus de 25 acides aminés, le couplage de la plupart des acides aminés est réalisé deux fois de suite. Le mélange de couplage est renouvelé par un mélange frais. Cette méthode permet
25 d'obtenir des rendements de couplage très élevés, ce qui est nécessaire lors de la synthèse de longs peptides.

Les différents acides aminés utilisés sont tous protégés par un groupement Fmoc sur l'amine en α de l'acide. Les chaînes latérales sont protégées par des groupements résistants aux agents basiques : t-butyl éther pour les fonctions
30 alcool de la sérine, de la thréonine et de la tyrosine, t-butyl ester pour les fonctions acides latérales des acides aspartique et glutamique, Boc (t-butyloxycarbonyl) pour la fonction amine latérale de la lysine, et trityle pour les fonctions amide de l'asparagine et de la glutamine.

Après la réaction de condensation d'un nouvel acide aminé protégé par
35 un groupement Fmoc, le contrôle de la réaction est fait sur un échantillon de résine

avant la réaction de déprotection : pour effectuer ce contrôle, on lave l'échantillon avec du dichlorométhane, on le sèche et on le pèse, puis on fait agir un mélange composé de 50% de pipéridine et 50% de dichlorométhane pendant 20 mn. On filtre la résine et on concentre le filtrat pour le reprendre avec un volume précis de
5 dichlorométhane. On détermine sur cette solution la teneur en dibenzofulvène par dosage par spectrométrie d'absorption U.V à 301 nm. On détermine ainsi le taux de substitution de la résine.

c) Libération du peptide

Lorsque tous les acides aminés ont été condensés en répétant autant de
10 fois que nécessaire des réactions analogues à l'exemple b), la résine est mise en présence d'un mélange composé de 90% d'acide trifluoroacétique, 5% d'anisole, 3% de dodécane-thiol et 2% d'eau pendant 3 heures à température ambiante. Le milieu réactionnel est filtré et le filtrat est mélangé à de l'éther diéthylique pour précipiter le peptide. Celui-ci est séparé par centrifugation et on obtient ainsi après
15 séchage le peptide brut.

d) Purification

Le peptide brut est dissous dans un mélange d'acétonitrile et d'une solution aqueuse de chlorohydrate de guanidine 8M puis purifié par chromatographie en phase inverse sous pression sur gel de silice greffée de type
20 RP18 en éluant avec un gradient composé d'eau à 0,1% d'acide trifluoroacétique (A) et d'acétonitrile contenant 0,1% d'acide trifluoroacétique (B), la composition variant de 20 à 70% de B sur une durée de 50 mn.

Les fractions contenant le peptide pur sont lyophilisées et on obtient le produit sous forme d'un solide blanc floconneux.

25 En variante, avant le stade b), quand il est nécessaire de fixer le premier acide aminé sur le bras de liaison de la résine, la fixation dudit premier acide aminé sur la résine de type WANG peut être réalisée comme suit :

- α) le couplage du premier acide aminé sur la résine de type WANG est réalisé en présence d'un catalyseur d'esterification, la diméthylaminopyridine (DMAP) de l'agent de condensation dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et de
30 l'hydroxybenzotriazole HOBt : ou encore,
- β) un mélange de 1 équivalent en acide aminé, 1 équivalent en 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium hexafluorophosphate (HBTU), et 2,2 équivalents de diisopropyléthylamine et 0,1 à 0,2 équivalent
35 de 4-diméthylaminopyridine.

Les produits obtenus après la purification du stade d) sont contrôlés par analyse séquentielle (sur un analyseur automatique utilisant la dégradation d'EDMAN), par HPLC analytique et par spectrométrie de masse (appareil MATT FINNIGAN TSQ 700 . triple quadrupole avec système d'ionisation ESI).

5 Les valeurs obtenues par spectrométrie de masse sont regroupées dans le tableau I, dans lequel figurent également des peptides connus qui ont été testés en comparaison avec les produits selon l'invention. Dans ce tableau, les peptides selon l'invention sont les exemples, identifiés par les valeurs x et y correspondant à la formule I et les produits indiqués "fragment 17-30", fragment "51-60" et
10 fragment "1-38 apoC1" sont des produits connus, décrits dans les demandes de brevet ou publication de l'art antérieur :

- "fragment 17-30" et "fragment 51-60" sont des fragments de l'apoAII décrits dans WO87-02062 comme étant des agents favorables au transport reverse du cholestérol.
- 15 - "fragment 1-38 apoC1 est un fragment de l'apo C1 de babouin, décrit comme inhibiteur de la CETP par R.S. Kushwaha (J. Lipid Res., 1993, 34, 1285-1297).

En bref, les peptides selon SEQ ID No. 1 sont tous nouveaux, à l'exception de ceux pour lesquels le couple (x, y) a les valeurs suivantes (0,0) ;
20 (13,0) ; (20,0) ; (23,0) ; (25,0) ; (27,0) ; (28,0) ; (29,0) ; (30,0) et (31,0).

En revanche, l'utilisation thérapeutique selon l'invention de tous les peptides selon SEQ ID No. 1, qu'ils soient connus ou nouveaux, est nouvelle.

Les peptides selon l'invention peuvent aussi être préparés par d'autres techniques connues de la chimie ou par les méthodes de génie génétique. Les
25 peptides peuvent être synthétisés et produits par des cultures de bactéries, de levures ou de cellules animales contenant un fragment d'ADN codant pour le peptide et les séquences d'ADN nécessaires à son expression.

ACTIVITE BIOLOGIQUE

Les peptides selon l'invention ont été évalués quant à leur potentiel
30 thérapeutique pour le traitement des hypercholestérolémies, par une mesure de leur pouvoir inhibiteur vis-à-vis de l'activité de la CETP.

On sait que pour augmenter l'élimination du cholestérol par les cellules hépatiques, il est important de favoriser le transport des esters de cholestérol par les HDL, et de limiter le transfert des esters de cholestérol des HDL vers le LDL.

Les produits selon l'invention ont été évalués en mesurant leur capacité à inhiber le transfert des esters de cholestérol des HDL vers les LDL résultant de l'activité CETP.

Pour effectuer ces mesures, on utilise des HDL associées à des esters de cholestérol marqués au tritium (^3H -CE-HDL) que l'on incube en présence de LDL, de CETP et des peptides selon l'invention. Après séparation des HDL et des LDL par précipitation puis centrifugation des LDL, le transfert des esters de cholestérol des HDL vers les LDL est mesuré par comptage de la radioactivité dans le surnageant. Cette méthode permet d'évaluer le pouvoir inhibiteur des différents peptides vis-à-vis de l'activité de la CETP. Des mesures identiques ont été faites avec l'apoAII et les produits connus de l'art antérieur.

A fin de comparaison, le pouvoir inhibiteur a d'abord été évalué pour l'apoAII à différentes concentrations : la mesure montre que l'inhibition augmente avec la concentration et que l'on atteint une inhibition presque totale au delà d'une concentration de 20 μM . Les valeurs obtenues sont reportées sur la figure 1 dans laquelle on a représenté l'inhibition en ordonnée (0% représente une absence d'inhibition, c'est-à-dire que l'activité de la CETP n'est pas perturbée et 100% représente une inhibition totale de la CETP c'est-à-dire que l'on retrouve les valeurs obtenues en l'absence de CETP), en fonction de la concentration en apoAII dans le milieu d'incubation. Les peptides selon l'invention ont été évalués à une concentration de 20 μM , soit la concentration à laquelle l'apoAII atteint son activité maximale.

PARTIE EXPERIMENTALE

a) Préparation des solutions de peptides

Après purification par HPLC (partie expérimentale de la synthèse), les peptides sont lyophilisés et conservés à -20°C .

Préalablement aux essais, les peptides sont dissous dans une solution de chlorure de guanidine 6 M pour obtenir une solution contenant 10 mg de peptide par ml. La solution est ensuite diluée deux fois avec du tampon 10 mM Tris, 150 mM NaCl à pH = 7,4 et chromatographiée par FPLC ("Fast Protein Liquid Chromatography") en utilisant une phase SUPERDEX[®] 30 (Pharmacia) et une solution de chlorure de guanidine 1 M, 10 mM Tris, pH = 7,4 comme éluant. Si nécessaire, les fractions obtenues sont concentrées sur membrane YM3 (Amicon) pour obtenir une concentration supérieure à 300 μM . Enfin, les sels résiduels de guanidine sont éliminés par chromatographie en utilisant une phase SEPHADEX[®]

25 Superfine, en éluant avec une solution contenant 500 mM NaCl, 10 mM Tris, 0,2% d'azoture de sodium. pH = 7,4. Les fractions contenant le peptide sont rassemblées et utilisées directement.

La concentration de chacun des peptides est déterminée par spectrométrie d'absorption à 276 nm en utilisant les coefficients d'extinction molaire de 1450 M⁻¹cm⁻¹ pour les peptides comportant une tyrosine, 2900 M⁻¹cm⁻¹ pour les peptides comportant 2 restes Tyrosines, 5945 M⁻¹cm⁻¹ pour l'apoAII d'origine humaine, et 5400 M⁻¹cm⁻¹ pour le fragment d'apoC1 de babouin connu de l'art antérieur. La concentration des fragments 17-30 et 51-60 de l'apoAII (produits connus) est déterminée par pesée.

b) Préparation de la CETP

Du sérum humain dépourvu en lipoprotéine (LPDS) est obtenu par centrifugation (70 heures) de plasma frais (250 ml) dont la densité est ajustée à d = 1.25 par addition de KBr solide.

Une fraction enrichie en CETP est obtenue à partir du LPDS par différentes chromatographies successives : chromatographie d'interactions hydrophobes (PHENYL SEPHAROSE[®], Pharmacia), chromatographie d'adsorption (HYDROXYLAPATITE[®], HA, Biorad) et chromatographie échangeuse d'ions (MONO Q ION EXCHANGE[®], Pharmacia).

Le LPDS est saturé par du NaCl solide, puis déposé sur une colonne de 900 ml de PHENYL SEPHAROSE[®] HS (Pharmacia) équilibrée par une solution de NaCl 4M. La colonne est éluee par environ deux litres d'un tampon Tris 10 mM, NaCl 150 mM à pH = 7,4, puis la CETP retenue est éluee par de l'eau pure.

La fraction aqueuse après chromatographie sur PHENYL SEPHAROSE[®] est concentrée sur membrane YM 30 (Amicon) pour obtenir un volume de 250 ml puis on ajoute du NaCl de façon à obtenir une concentration de 2 M. Cette fraction est chromatographiée sur une colonne de 50 ml de PHENYL SUPEROSE[®] (Pharmacia) à un débit de 5 ml/min. La colonne est éluee par 50 ml d'une solution aqueuse de NaCl à 2 M, puis par un gradient linéaire de 500 ml allant de 2 M en NaCl à du tampon Tris 10 mM, 150 mM NaCl pH = 7,4 et pour terminer par 200 ml du même tampon Tris. La CETP retenue est ensuite éluee par de l'eau pure (comme précédemment). La fraction contenant la CETP, ajustée à 50 mM en NaCl, 10 mM Tris, 0,2% en azoture de sodium et pH = 7,4, est ensuite concentrée sur membrane YM30 (Amicon) pour obtenir environ 16 ml de solution.

L'activité spécifique de la CETP est de 3,0 à $3,4 \cdot 10^{-7}$ mole de CE transférée par milligramme de protéine et par heure.

c) Préparation de l'apoprotéine AII

L'apoprotéine AII est purifiée à partir d'une préparation contenant les
5 protéines extraites des HDL. Les HDL sont isolées à partir de 1 litre de plasma humain frais par deux ultracentrifugations consécutives (rotor 45 Ti, 40.000 rpm, 20 °C), l'une à une densité de 1,07 pendant au moins 24 heures, l'autre à une densité de 1,25 pendant 48 heures (les densités sont ajustées par addition de KBr solide).

10 La fraction contenant les HDL est ensuite chromatographiée sur une colonne de 40 ml de CONCAVALIN® A (Pharmacia) afin d'éliminer l'apoprotéine E et les traces contaminantes d'apoprotéine B.

La fraction contenant les HDL (environ 50 ml) est ensuite dialysée trois fois contre 1 litre de tampon Tris 10 mM, NaCl 150 mM à pH = 7,4 pendant une
15 heure. Les protéines en solution dans environ 50 ml d'eau sont extraites des HDL par trois délipidations successives à l'aide de mélanges ethanol/ether (à raison de deux litres de mélange pour les HDL issues d'un litre de plasma pour les deux premières et un litre de mélange pour les HDL issues d'un litre de plasma dans la dernière) dont la concentration en éther augmente (3/1, 1/1, 1/3, V/V). Lors de la
20 première délipidation la phase organique est éliminée par décantation; lors des deux autres elle est éliminée par centrifugation. Pour terminer, les protéines sont lavées avec de l'éther pur.

Les protéines (apo HDL) extraites des HDL sont dissoutes dans 20 ml d'une solution 6 M en chlorure de guadinine sous agitation pendant une nuit.

25 Après dilution par 20 ml de tampon Tris 10 mM, NaCl 150 mM à pH = 7,4, la fraction protéique est centrifugée pour éliminer les agrégats insolubles puis chromatographiée (gel filtration) sur une colonne de 300 ml de SUPERDEX® 75 (Pharmacia) avec un Tampon Tris 10 mM, 1 M en chlorure de guadinine, pH = 7,4 comme solvant d'élution. Dans ces conditions non réduc-
30 trices, l'apoAII est éluée après le pic correspondant à l'apoprotéine AI. Les fractions contenant l'apoAII sont rassemblées et incubées pendant une heure en présence de DTT (dithiothréitol) à 6,5 mM. La solution est finalement chroma-
tographiée à nouveau sur colonne de Sephadex 75. Dans ces conditions, l'apoAII, présente en solution sous sa forme monomère, est séparée de l'apoAI ; les fractions

sont rassemblées et stockées à 4 °C pour une utilisation ultérieure (la teneur en apoAII est déterminée par dosage en spectrométrie U.V.).

d) Préparation des lipoprotéines marquées aux esters de cholestérol tritiés

Les HDL marquées aux esters de cholestérol tritiés (^3H -CE) sont
5 préparées en incubant les HDL purifiées en présence de vésicules de phosphatidylcholine de jaune d'oeuf (EPC) contenant du ^3H -CE. Pour préparer les vésicules d'EPC - ^3H -CE, 8 mg d'EPC sont dissous dans 20 ml de p-xylène auquel on rajoute 9,25 MBq de ^3H -CE (Amersham-Buchler) dans 250 μl de toluène. Après congélation le mélange est lyophilisé.

10 Le mélange EPC - ^3H -CE est dispersé dans 4 ml de tampon 10 mM Tris, 150 mM NaCl à pH = 7,4 puis traité par une sonde à ultrasons pendant 5 minutes à 10 °C. Le traitement aux ultrasons est répété 6 fois jusqu'à obtenir un éclaircissement du mélange.

Les HDL sont purifiées par ultracentrifugation dans un rotor 45 Ti
15 (Beckman) à 40.000 tr/mn pendant 24 heures à partir de 250 ml de plasma frais, auxquels sont ajoutés des conservateurs (1 mM pCMB (acide p-chloromercurobenzoïque), 10 mM DTNB (acide 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoïque)), 10 mM EDTA (acide éthylènediaminetétracétique), 0,02% NaN_3), dont le pH est ajusté à pH = 7,4 et la densité est ajustée à 1,07 par du KBr solide. Le surnageant
20 contenant les lipoprotéines autres que les HDL est éliminé. Les 4 ml de vésicules d'EPC marquées au ^3H -CE (vés. ^3H -CE-EPC) sont rajoutés à la fraction contenant les HDL puis celle-ci est incubée 70 heures à 37 °C. La fraction est centrifugée dans un rotor 70 Ti à 50.000 tr/mn pendant 24 heures, le surnageant contenant les lipides est éliminé. La densité est ajustée à 1,25 par du KBr solide, puis la fraction
25 est centrifugée dans un rotor 70 Ti 50.000 tr/mn pendant 48 heures. La fraction contenant les HDL marquées purifiées est stockée à 4 °C.

e) Essais d'inhibition de l'activité CETP :

Comme indiqué précédemment, l'activité de la CETP est déterminée en mesurant le transfert des esters de cholestérol tritiés portés par les HDL vers les
30 LDL. Pour effectuer cette mesure, 35 à 40 μl de la fraction enrichie en CETP sont incubés en présence de HDL associées au ^3H -CE (équivalent à 10 μg de cholestérol) et de LDL (équivalent à 100 μg de cholestérol), en présence ou non du peptide dont on veut déterminer l'activité. Le mélange est complété à 500 μl par une solution 25 mM de phosphate de sodium 150 mM NaCl, 1,4 mM EDTA,

2,5 mM DTNB, 1% d'albumine de sérum de bovin et pH = 7,4. L'incubation dure 3 heures à 37 °C.

A la fin de l'incubation, la réaction de transfert des esters de cholestérol entre les lipoprotéines est arrêtée par addition de 500 µl d'une solution de phosphotungstate de magnésium (PTA) (concentration finale : 0,048 % PTA, 12 mM Mg^{2+}). Les LDL précipitées sont éliminées par centrifugation et la radioactivité du surnageant est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide (on ajoute 10 ml de liquide à scintillation au surnageant et le comptage s'effectue pendant 10 mn). Dans ces conditions, l'activité de la CETP seule correspond à $1,89 \cdot 10^{-3}$ mole de CE transféré des HDL vers les LDL par heure.

Pour évaluer le pouvoir inhibiteur d'un peptide sur l'activité de la CETP, on effectue simultanément 4 mesures dans les conditions suivantes :

- la première mesure S_1 représente la radioactivité en dpm mesurée dans le surnageant de l'essai contenant les lipoprotéines, la CETP et le peptide (activité modifiée de la CETP).
- la seconde mesure S_2 représente la radioactivité en dpm mesurée dans le surnageant de l'essai contenant les lipoprotéines et la CETP (activité normale de la CETP).
- la troisième mesure B_1 représente la radioactivité en dpm mesurée dans le surnageant de l'essai contenant seulement les lipoprotéines (contrôle "à blanc").
- la quatrième mesure B_2 représente la radioactivité en dpm mesurée dans le surnageant de l'essai contenant les lipoprotéines et le peptide (contrôle à blanc en présence du peptide).

L'activité normale de la CETP est représentée par la différence $B_1 - S_2$ (cette valeur est directement proportionnelle à l'activité de la CETP).

L'activité modifiée de la CETP en présence du peptide est représentée par la différence $B_2 - S_1$ (cette valeur est directement proportionnelle à l'activité modifiée de la CETP et supprime une éventuelle activité qui pourrait être due au peptide seul).

On peut exprimer l'activité inhibitrice du peptide en fonction de la quantité relative des esters de cholestérol transférés en 3 heures en l'absence ou en présence du peptide par la valeur :

$$\% \text{ CE} = \frac{B_2 - S_1}{B_1 - S_t} \times 100$$

5 Ainsi, un peptide non inhibiteur autorisera un transfert de CE identique à celui qui est observé en présence de la CETP seule et la valeur relative sera de 100%. Inversement, un peptide très inhibiteur supprime totalement le transfert (toute la radioactivité est conservée dans le surnageant) et on obtient une valeur relative de 0%.

10 Pour obtenir une valeur représentative de l'inhibition IN proportionnelle au pouvoir inhibiteur du peptide vis-à-vis de la CETP on utilise la formule :

$$\text{IN(exprimé en \%)} = \frac{(B_1 - S_t) - (B_2 - S_1)}{B_1 - S_t} \times 100$$

15 Suivant cette expression, un peptide totalement inhibiteur de l'activité CETP conduit à une valeur IN = 100%. Inversement, un peptide inactif conduit à une valeur IN = 0% et un peptide possédant une action stimulatrice de la CETP
20 fera apparaître une valeur IN négative.

Les essais décrits ci-dessus ont été conduits avec l'apoprotéine AII à différentes concentrations afin de déterminer une concentration minimale permettant une inhibition importante de l'activité de la CETP.

25 Les résultats de ces mesures sont représentés sous forme de graphe dans la figure 1 qui indique en ordonnée l'activité inhibitrice obtenue en fonction de la concentration de l'apoAII. Compte tenu des valeurs obtenues pour l'apoAII, les essais faits avec les peptides selon l'invention ont été conduits à une concentration 20 µM. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau II dans lequel figurent les peptides selon l'invention indiqués en exemples et les trois produits de l'art
30 antérieur mentionnés précédemment. Pour chaque produit testé, on a indiqué la valeur IN (pouvoir inhibiteur de l'activité de la CETP) et la valeur INR qui exprime le pouvoir inhibiteur des peptides par rapport au pouvoir inhibiteur de l'apoAII à une concentration 20 µM.

35 Les peptides selon l'invention sont des inhibiteurs de la CETP et de ce fait, leur aptitude à ralentir ou inhiber le transfert du cholestérol, des triglycérides,

des esters de rétinol ou des phospholipides peut être mise à profit pour en faire des principes actifs de médicaments.

Conviennent notamment les peptides de formule I ci-dessus où x est compris entre 8 et 15, d'une part, et entre 20 et 23, d'autre part.

- 5 Un autre objet de l'invention concerne donc des compositions pharmaceutiques contenant un ou plusieurs peptides selon l'invention en quantité thérapeutiquement efficace et en association avec un excipient physiologiquement acceptable.

- 10 De telles compositions pharmaceutiques sont, de préférence, destinées au traitement préventif ou curatif des affections liées aux hypercholestérolémies. En particulier ces compositions pharmaceutiques trouvent leur utilisation préférée dans la prophylaxie des plaques d'athérome, la régression des plaques d'athérome et la diminution des risques d'accidents cardio-vasculaires.

TABLEAU I

Exemple (SEQ. ID)	x	y	Masse théorique	Masse expérimentale mesurée
1 (SEQ. ID No. 1)	0	0	5745,6	5743,6 \pm 1,0
2 (SEQ. ID No. 2)	8	0		
3 (SEQ. ID No. 3)	9	0		
4 (SEQ. ID No. 4)	10	0	4635,3	4633,7 \pm 0,8
5 (SEQ. ID No. 5)	11	0		
6 (SEQ. ID No. 6)	12	0	4435,1	4435,6 \pm 1,7
7 (SEQ. ID No. 7)	14	0	4216,90	4217,0 \pm 0,7
8 (SEQ. ID No. 8)	16	0	3909,50	3908,2 \pm 0,1
9 (SEQ. ID No. 9)	18	0	3652,20	3650,8 \pm 0,9
10 (SEQ. ID No. 10)	20	0	3437,00	3437,6 \pm 0,5
11 (SEQ. ID No. 11)	22	0	3179,70	3177,8 \pm 0,6
12 (SEQ. ID No. 12)	24	0	2965,40	2965,7 \pm 0,3
13 (SEQ. ID No. 13)	26	0	2755,20	2754,0 \pm 0,4
14 (SEQ. ID No. 14)	28	0	2513,80	2513,1 \pm 0,4
15 (SEQ. ID No. 15)	30	0		
16 (SEQ. ID No. 16)	9	4	4308,90	4309,1 \pm 0,3
17 (SEQ. ID No. 17)	11	4	4108,80	4107,7 \pm 0,4
18 (SEQ. ID No. 18)	13	4	3909,50	3908,2 \pm 0,2
19 (SEQ. ID No. 19)	15	4	3659,20	3658,5 \pm 0,0
20 (SEQ. ID No. 20)	0	4		
apo AII			8690,9	8691
frag 1-38 apo C babouin			4276,80	4276,7 \pm 0,3
frag. 51-60			1069,30	1069,60
frag. 17-30			1626,90	1626,7 \pm 0,5

TABLEAU II

EXEMPLE	x	y	IN	INR
1	0	0	36.70	42.3
2	9	0	39.62	45.7
3	10	0	39.01	45.0
4	11	0	51.10	59.0
5	12	0	71.02	81.9
6	14	0	32.78	37.8
7	16	0	15.77	18.2
8	18	0	11.19	12.9
9	20	0	23.55	27.2
10	22	0	40.45	46.7
11	24	0	12.60	14.5
12	26	0	12.02	13.9
13	28	0	6.84	7.9
14	30	0	1.95	2.2
15	9	4	39.84	46.0
16	11	4	38.75	44.7
17	13	4	38.22	44.1
18	15	4	13.10	15.1
apoAII 10 μ M			58.87	67.9
apoAII 20 μ M			86.67	100
frag 51-60			-2.59	-3.0
frag 17-30			1.01	1.2
1-38 apo C ₁ babouin			0.42	0.5

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE :

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: LABORATOIRES FOURNIER S.C.A.
- (B) RUE: 9, rue Petitot
- (C) VILLE: DIJON
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL (ZIP): 21000

(ii) TITRE DE L'INVENTION: Peptides inhibiteurs de la protéine de transfert des esters de cholestérol et leur utilisation en thérapeutique

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 20

(iv) FORME LISIBLE SUR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE MEDIUM: Disquette
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME DE TRAITEMENT: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPO)

(vi) DONNEES DE LA DEMANDE ANTERIEURE:

- (A) NUMERO DE DEPOT: FR 9410037
- (B) DATE DE DEPOT: 16-AOUT-1994

(2) INFORMATION POUR SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 51 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) TOPOLOGIE: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

Glu Lys Val Lys Ser Pro Glu Leu Gln Ala Glu Ala Lys Ser Tyr Phe
1 5 10 15

Glu Lys Ser Lys Glu Gln Leu Thr Pro Leu Ile Lys Lys Ala Gly Thr
20 25 30

Glu Leu Val Asn Phe Leu Ser Tyr Phe Val Glu Leu Gly Thr Gln Pro
35 40 45

Ala Thr Gln
50

(2) INFORMATION POUR SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 43 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) TOPOLOGIE: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

```

Gln Ala Glu Ala Lys Ser Tyr Phe Glu Lys Ser Lys Glu Gln Leu Thr
1           5           10           15
Pro Leu Ile Lys Lys Ala Gly Thr Glu Leu Val Asn Phe Leu Ser Tyr
          20           25           30
Phe Val Glu Leu Gly Thr Gln Pro Ala Thr Gln
          35           40

```

(2) INFORMATION POUR SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 42 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) TOPOLOGIE: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

```

Ala Glu Ala Lys Ser Tyr Phe Glu Lys Ser Lys Glu Gln Leu Thr Pro
1           5           10           15
Leu Ile Lys Lys Ala Gly Thr Glu Leu Val Asn Phe Leu Ser Tyr Phe
          20           25           30
Val Glu Leu Gly Thr Gln Pro Ala Thr Gln
          35           40

```

(2) INFORMATION POUR SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 41 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) TOPOLOGIE: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

```

Glu Ala Lys Ser Tyr Phe Glu Lys Ser Lys Glu Gln Leu Thr Pro Leu
1           5           10           15
Ile Lys Lys Ala Gly Thr Glu Leu Val Asn Phe Leu Ser Tyr Phe Val
          20           25           30
Glu Leu Gly Thr Gln Pro Ala Thr Gln
          35           40

```

(2) INFORMATION POUR SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 40 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) TOPOLOGIE: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

Ala Lys Ser Tyr Phe Glu Lys Ser Lys Glu Gln Leu Thr Pro Leu Ile
1 5 10 15
Lys Lys Ala Gly Thr Glu Leu Val Asn Phe Leu Ser Tyr Phe Val Glu
20 25 30
Leu Gly Thr Gln Pro Ala Thr Gln
35 40

(2) INFORMATION POUR SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 39 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) TOPOLOGIE: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

Lys Ser Tyr Phe Glu Lys Ser Lys Glu Gln Leu Thr Pro Leu Ile Lys
1 5 10 15
Lys Ala Gly Thr Glu Leu Val Asn Phe Leu Ser Tyr Phe Val Glu Leu
20 25 30
Gly Thr Gln Pro Ala Thr Gln
35

(2) INFORMATION POUR SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 37 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) TOPOLOGIE: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

Tyr Phe Glu Lys Ser Lys Glu Gln Leu Thr Pro Leu Ile Lys Lys Ala
1 5 10 15
Gly Thr Glu Leu Val Asn Phe Leu Ser Tyr Phe Val Glu Leu Gly Thr
20 25 30
Gln Pro Ala Thr Gln
35

(2) INFORMATION POUR SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 35 acides aminés

- (B) TYPE: acide aminé
- (D) TOPOLOGIE: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

```

Glu Lys Ser Lys Glu Gln Leu Thr Pro Leu Ile Lys Lys Ala Gly Thr
1      5      10      15
Glu Leu Val Asn Phe Leu Ser Tyr Phe Val Glu Leu Gly Thr Gln Pro
      20      25      30
Ala Thr Gln
      35

```

(2) INFORMATION POUR SEQ ID NO: 9:

- (i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 33 acides aminés
 - (B) TYPE: acide aminé
 - (D) TOPOLOGIE: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

```

Ser Lys Glu Gln Leu Thr Pro Leu Ile Lys Lys Ala Gly Thr Glu Leu
1      5      10      15
Val Asn Phe Leu Ser Tyr Phe Val Glu Leu Gly Thr Gln Pro Ala Thr
      20      25      30
Gln

```

(2) INFORMATION POUR SEQ ID NO: 10:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 31 acides aminés
 - (B) TYPE: acide aminé
 - (D) TOPOLOGIE: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

```

Glu Gln Leu Thr Pro Leu Ile Lys Lys Ala Gly Thr Glu Leu Val Asn
1      5      10      15
Phe Leu Ser Tyr Phe Val Glu Leu Gly Thr Gln Pro Ala Thr Gln
      20      25      30

```

(2) INFORMATION POUR SEQ ID NO: 11:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 29 acides aminés
 - (B) TYPE: acide aminé

(D) TOPOLOGIE: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

Leu Thr Pro Leu Ile Lys Lys Ala Gly Thr Glu Leu Val Asn Phe Leu
1 5 10 15
Ser Tyr Phe Val Glu Leu Gly Thr Gln Pro Ala Thr Gln
20 25

(2) INFORMATION POUR SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 27 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) TOPOLOGIE: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

Pro Leu Ile Lys Lys Ala Gly Thr Glu Leu Val Asn Phe Leu Ser Tyr
1 5 10 15
Phe Val Glu Leu Gly Thr Gln Pro Ala Thr Gln
20 25

(2) INFORMATION POUR SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 25 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) TOPOLOGIE: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

Ile Lys Lys Ala Gly Thr Glu Leu Val Asn Phe Leu Ser Tyr Phe Val
1 5 10 15
Glu Leu Gly Thr Gln Pro Ala Thr Gln
20 25

(2) INFORMATION POUR SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 23 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) TOPOLOGIE: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

Lys Ala Gly Thr Glu Leu Val Asn Phe Leu Ser Tyr Phe Val Glu Leu
 1 5 10 15
 Gly Thr Gln Pro Ala Thr Gln
 20

(2) INFORMATION POUR SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 21 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) TOPOLOGIE: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

Gly Thr Glu Leu Val Asn Phe Leu Ser Tyr Phe Val Glu Leu Gly Thr
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Thr Gln
 20

(2) INFORMATION POUR SEQ ID NO: 16:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 38 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) TOPOLOGIE: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

Ala Glu Ala Lys Ser Tyr Phe Glu Lys Ser Lys Glu Gln Leu Thr Pro
 1 5 10 15
 Leu Ile Lys Lys Ala Gly Thr Glu Leu Val Asn Phe Leu Ser Tyr Phe
 20 25 30
 Val Glu Leu Gly Thr Gln
 35

(2) INFORMATION POUR SEQ ID NO: 17:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 36 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) TOPOLOGIE: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:

Ala Lys Ser Tyr Phe Glu Lys Ser Lys Glu Gln Leu Thr Pro Leu Ile
 1 5 10 15
 Lys Lys Ala Gly Thr Glu Leu Val Asn Phe Leu Ser Tyr Phe Val Glu
 20 25 30
 Leu Gly Thr Gln
 35

(2) INFORMATION POUR SEQ ID NO: 18:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 34 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) TOPOLOGIE: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:

Ser Tyr Phe Glu Lys Ser Lys Glu Gln Leu Thr Pro Leu Ile Lys Lys
 1 5 10 15
 Ala Gly Thr Glu Leu Val Asn Phe Leu Ser Tyr Phe Val Glu Leu Gly
 20 25 30
 Thr Gln

(2) INFORMATION POUR SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 32 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) TOPOLOGIE: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

Phe Glu Lys Ser Lys Glu Gln Leu Thr Pro Leu Ile Lys Lys Ala Gly
 1 5 10 15
 Thr Glu Leu Val Asn Phe Leu Ser Tyr Phe Val Glu Leu Gly Thr Gln
 20 25 30

(2) INFORMATION POUR SEQ ID NO: 20:

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 47 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) TOPOLOGIE: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:

Glu Lys Val Lys Ser Pro Glu Leu Gln Ala Glu Ala Lys Ser Tyr Phe
1 5 10 15

Glu Lys Ser Lys Glu Gln Leu Thr Pro Leu Ile Lys Lys Ala Gly Thr
20 25 30

Glu Leu Val Asn Phe Leu Ser Tyr Phe Val Glu Leu Gly Thr Gln
35 40 45

REVENDECATIONS

5

1. Peptide, fragment de l'apoprotéine AII, caractérisé en ce qu'il répond à la formule :



10

dans laquelle :

- Pep est le fragment 27-77 de l'apoprotéine AII (forme monomère) et correspond à la séquence :

15

EKVKSPQLQA EAKSYFEKSK EQLTPLIKKA GTELVNFLSY
FVELGTOPAT Q

(SEQ. ID. No 1)

- 20 - ΔN_x correspond à une délétion des x acides aminés N-terminaux du peptide
Pep défini ci-dessus.
- ΔC_y correspond à une délétion des y acides aminés C-terminaux du peptide
Pep défini ci-dessus.
- x est un nombre entier compris entre 0 et 31 (ces valeurs étant incluses),
- y est un nombre entier compris entre 0 et 4 (ces valeurs étant incluses),
- 25 à l'exclusion des peptides pour lesquels les valeurs du couple (x, y) sont
respectivement : (0,0) ; (13,0) ; (20,0) ; (23,0) ; (25,0) ; (27,0) ; (28,0) ; (29,0) ;
(30,0) et (31,0).

2. Peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce que dans la formule I, x est compris entre 8 et 15.

30 3. Peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce que dans la formule I, x est compris entre 20 et 23.

4. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle contient, en association avec un excipient physiologiquement acceptable, au moins un peptide de formule :

35

ΔN_x Pep ΔC_y (I)

dans laquelle :

- 5 - Pep est le fragment 27-77 de l'apoprotéine AII (forme monomère) et correspond à la séquence :

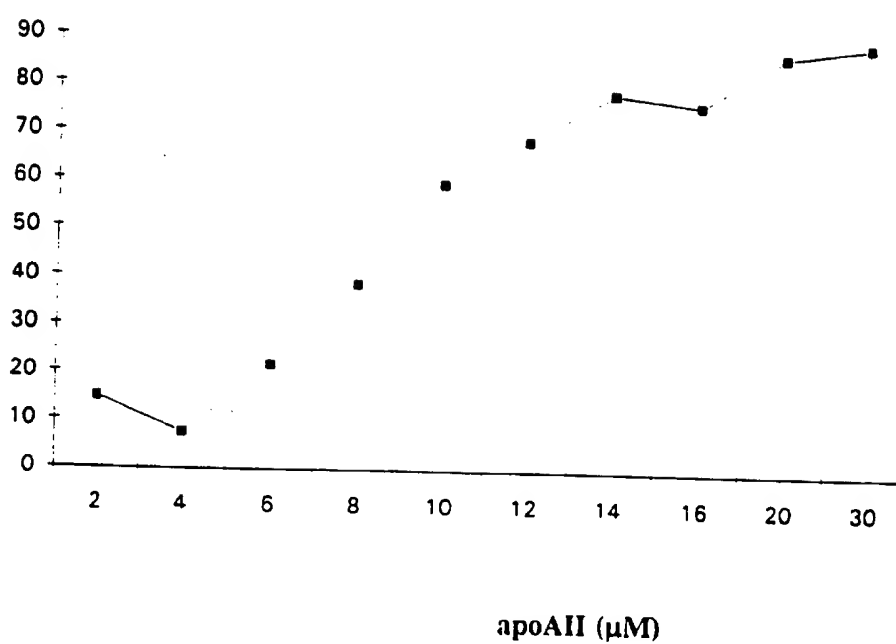
EKVKSPQLQA EAKSYFEKSK EQLTPLIKKA GTELVNFLSY
FVELGTQPAT Q

10 (SEQ. ID No 1)

- ΔN_x correspond à une délétion des x acides aminés N-terminaux du peptide Pep défini ci-dessus.
- ΔC_y correspond à une délétion des y acides aminés C-terminaux du peptide Pep défini ci-dessus.
- 15 - x est un nombre entier compris entre 0 et 31 (ces valeurs étant incluses),
- y est un nombre entier compris entre 0 et 4 (ces valeurs étant incluses), selon une quantité thérapeutiquement efficace.
5. Composition pharmaceutique selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle est destinée au traitement ou à la prévention des affections liées aux
- 20 hypercholestérolémies.
6. Composition pharmaceutique selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle est destinée à la prophylaxie ou la régression des plaques d'athérome et/ou la diminution des risques d'accidents cardio-vasculaires.

Figure n° 1

% d'inhibition



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter national application No

PCT/FR 95/01076

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07K14/775 A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>J. CLIN. INVEST. (1994), 94(6), 2457-67 CODEN: JCINAO; ISSN: 0021-9738, ZHONG, SHAOBIN ET AL 'Human apoA-II inhibits the hydrolysis of HDL triglyceride and the decrease of HDL size induced by hypertriglyceridemia and cholesteryl ester transfer protein in transgenic mice' see page 2457 see page 2464, right column - page 2466, right column, paragraph 1 --- -/--</p>	1-3

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 October 1995

Date of mailing of the international search report

30.11.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Fuhr, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/FR 95/01076

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>JOURNAL OF LIPID RESEARCH, vol. 33, no. 2, pages 215-224, K.-A. RYE ET AL. 'Changes in the size of reconstituted high density lipoproteins during incubation with cholesteryl ester transfer protein: the role of apolipoproteins' see page 221, right column, paragraph 3 - page 224, left column, paragraph 1 see page 222, right column, paragraph 2 ---</p>	1-6
X	<p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 269, no. 5, 4 February 1994 BALTIMORE, MD US, pages 3189-3197, L. LAGROST ET AL. 'Influence of Apolipoprotein Composition of High Density Lipoprotein Particles on Cholesteryl Ester Transfer Protein Activity' cited in the application see page 3194, left column, last paragraph - page 3196, right column, last paragraph ---</p>	1-3
A	<p>PEPTIDES (FAYETTEVILLE, N. Y.) (1983), 4(3), 343-9 CODEN: PPTDD5;ISSN: 0196-9781, BHATNAGAR, PRADIP K. ET AL 'The application of an improved solid phase synthetic technique to the delineation of an antigenic site of apolipoprotein A-II' cited in the application see page 346, left column, last paragraph - right column, paragraph 1 ---</p>	1
A	<p>BIOCHEMISTRY (1981), 20(6), 1676-80 CODEN: BICHAW;ISSN: 0006-2960, MAO, SIMON J. T. ET AL 'Mechanism of lipid-protein interaction in the plasma lipoproteins: identification of a lipid-binding site in apolipoprotein A-II' cited in the application see page 4155, left column, paragraph 2 - right column, last paragraph; figure 1; table II --- -/--</p>	1-3

1.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter Application No
PCT/FR 95/01076

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BIOCHEMISTRY (1977), 16(19), 4150-6 CODEN: BICHAW, MAO, S. J. T. ET AL 'Mechanism of lipid-protein interaction in the plasma lipoproteins: lipid-binding properties of synthetic fragments of apolipoprotein A-II' cited in the application see page 1678, right column, last paragraph - page 1680, left column, last paragraph; figure 1; table I ---	1-3
A	WO,A,93 11782 (SOUTHWEST FOUND BIOMED RES) 24 June 1993 cited in the application see claims; examples -----	1-6

Information on patent family members

nal Application No

PCT/FR 95/01076

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C07K14/775 A61K38/17

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	J. CLIN. INVEST. (1994), 94(6), 2457-67 CODEN: JCINAO; ISSN: 0021-9738, ZHONG, SHAOBIN ET AL 'Human apoA-II inhibits the hydrolysis of HDL triglyceride and the decrease of HDL size induced by hypertriglyceridemia and cholesteryl ester transfer protein in transgenic mice' voir page 2457 voir page 2464, colonne de droite - page 2466, colonne de droite, alinéa 1 --- -/--	1-3

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

& document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

27 Octobre 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

30.11.95

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Fuhr, C

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>JOURNAL OF LIPID RESEARCH, vol. 33, no. 2, pages 215-224, K.-A. RYE ET AL. 'Changes in the size of reconstituted high density lipoproteins during incubation with cholesteryl ester transfer protein: the role of apolipoproteins' voir page 221, colonne de droite, alinéa 3 - page 224, colonne de gauche, alinéa 1 voir page 222, colonne de droite, alinéa 2 ---</p>	1-6
X	<p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 269, no. 5, 4 Février 1994 BALTIMORE, MD US, pages 3189-3197, L. LAGROST ET AL. 'Influence of Apolipoprotein Composition of High Density Lipoprotein Particles on Cholesteryl Ester Transfer Protein Activity' cité dans la demande voir page 3194, colonne de gauche, dernier alinéa - page 3196, colonne de droite, dernier alinéa ---</p>	1-3
A	<p>PEPTIDES (FAYETTEVILLE, N. Y.) (1983), 4(3), 343-9 CODEN: PPTDD5;ISSN: 0196-9781, BHATNAGAR, PRADIP K. ET AL 'The application of an improved solid phase synthetic technique to the delineation of an antigenic site of apolipoprotein A-II' cité dans la demande voir page 346, colonne de gauche, dernier alinéa - colonne de droite, alinéa 1 ---</p>	1
A	<p>BIOCHEMISTRY (1981), 20(6), 1676-80 CODEN: BICHAW;ISSN: 0006-2960, MAO, SIMON J. T. ET AL 'Mechanism of lipid-protein interaction in the plasma lipoproteins: identification of a lipid-binding site in apolipoprotein A-II' cité dans la demande voir page 4155, colonne de gauche, alinéa 2 - colonne de droite, dernier alinéa; figure 1; tableau II ---</p>	1-3

-/--

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>BIOCHEMISTRY (1977), 16(19), 4150-6 CODEN: BICHAW, MAO, S. J. T. ET AL 'Mechanism of lipid-protein interaction in the plasma lipoproteins: lipid-binding properties of synthetic fragments of apolipoprotein A-II' cité dans la demande voir page 1678, colonne de droite, dernier alinéa - page 1680, colonne de gauche, dernier alinéa; figure 1; tableau I ---</p>	1-3
A	<p>WO,A,93 11782 (SOUTHWEST FOUND BIOMED RES) 24 Juin 1993 cité dans la demande voir revendications; exemples -----</p>	1-6

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Internationale No

PCT/FR 95/01076

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9311782	24-06-93	EP-A- 0618803	12-10-94
